

# EUROPEAN PATENT OFFICE

## Patent Abstracts of Japan

PUBLICATION NUMBER : 63248394  
PUBLICATION DATE : 14-10-88

APPLICATION DATE : 06-04-87  
APPLICATION NUMBER : 62083998

APPLICANT : KYOWA HAKKO KOGYO CO LTD;

INVENTOR : HAGIWARA TAKESHIGE;

INT.CL. : C12P 19/40 C12N 1/20 C12N 15/00 C12P 19/32 //(C12N 1/20 , C12R 1:185 ),  
(C12N 1/20 , C12R 1:15 ), (C12N 1/20 , C12R 1:13 )

TITLE : PRODUCTION OF NUCLEIC ACID-RELATING SUBSTANCE

ABSTRACT : PURPOSE: To obtain a nucleic acid-relating substance in high efficiency at a low cost, by culturing a microbial strain belonging to Corynebacterium genus or Brevibacterium genus and containing a recombinant DNA of a vector DNA and a DNA fragment containing gene of APTase.

CONSTITUTION: A microbial strain belonging to Corynebacterium genus or Brevibacterium genus is transformed with a recombinant DNA derived from (A) a DNA fragment containing gene (hereinafter called as purF) of amidophosphoribosyl transferase (APTase) which is an enzyme participating in biosynthesis of purine nucleotide, preferably a DNA fragment containing purF originated from bacterium belonging to Escherichia genus, Corynebacterium genus or Brevibacterium genus and (B) a vector DNA which can be proliferated in bacterial cell of Corynebacterium genus or Brevibacterium genus by autonomous replication. The obtained transformant is cultured in a medium to obtain nucleic acid-relating substances such as inosine, 5'-inosinic acid and 5'-xanthylic acid.

COPYRIGHT: (C)1988,JPO&Japio

BEST AVAILABLE COPY

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭63-248394

⑪ Int. Cl.

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和63年(1988)10月14日

C 12 P 19/40

C 12 N 1/20

C 12 P 15/00

C 12 P 19/32

(C 12 N 1/20

C 12 R 1:185)

(C 12 N 1/20

C 12 R 1:15)

(C 12 N 1/20

C 12 R 1:13)

7236-4B

8515-4B

A-8412-4B

7236-4B

審査請求 未請求 発明の数 3 (全9頁)

⑭ 発明の名称 核酸関連物質の製造法

⑮ 特 願 昭62-83998

⑯ 出 願 昭62(1987)4月6日

⑰ 発 明 者 藤 尾 達 郎 神奈川県相模原市相模台6-29-1

⑱ 発 明 者 勝 亦 一 東京都町田市成瀬2-12-3 ポプラ丘コープ6-401

⑲ 発 明 者 萩 原 健 茂 東京都町田市成瀬台2-32-3 ポプラ丘コープ20-406

⑳ 出 願 人 協和発酵工業株式会社 東京都千代田区大手町1丁目6番1号

明 細 書

1. 発明の名称

核酸関連物質の製造法

2. 特許請求の範囲

(1) 微生物のアミドフォスホリボシル・トランスフェラーゼの合成に関与する遺伝情報を担うDNA断片とベクターDNAとの組換え体DNAを保有し、コリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属に属し、かつ核酸関連物質を生産する能力を有する微生物を培地に培養し、培養物中に核酸関連物質を生成蓄積させ、該培養物から該核酸関連物質を採取することを特徴とする核酸関連物質の製造法。

(2) 該DNA断片がエシェリヒア属、コリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属に属する微生物から得られるDNA断片であることを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の製造法。

(3) 該核酸関連物質がイノシン、イノシン酸またはキサンチル酸であることを特徴とする特許請

求の範囲第1項記載の製造法。

(4) エシェリヒア属、コリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属に属する微生物のアミドフォスホリボシル・トランスフェラーゼの合成に関与する遺伝情報を担うDNA断片とベクターDNAとの組換え体DNA。

(5) エシェリヒア属、コリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属に属する微生物のアミドフォスホリボシル・トランスフェラーゼの合成に関与する遺伝情報を担うDNA断片とベクターDNAとの組換え体DNAを保有し、コリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属に属し、かつ核酸関連物質を生産する能力を有する微生物。

3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明はプリンスクレオチド合成に関与する酵素であるアミドフォスホリボシル・トランスフェラーゼ(EC2.4.2.14、以下APTaseと称することもある)の合成に関与する遺伝子を含

むDNA断片とベクターDNAとの組換え体DNAを用いて、コリネバクテリウム属またはブレビバクテリウム属に属する微生物を形質転換し、得られる形質転換株を培地に培養し、培養物中にイノシン、5'-イノシン酸、5'-キサンチル酸などの核酸関連物質を生成蓄積させ、該培養物から該核酸関連物質を採取する核酸関連物質の製造法に関する。

核酸関連物質は、調味料、医薬品原料として有用であることから、本発明は食品および医薬品工業の分野に属する。

#### 従来の技術

核酸関連物質の製造法としては、リボ核酸を分解する方法、発酵生産した前駆物質を合成法により目的物質に変換する方法、微生物により直接発酵生産する方法などが知られている。発酵法で核酸関連物質を生産する方法については、野生株から誘導された突然変異株を用いる方法が知られている。たとえば5'-イノシン酸生産性変異株（特公昭58-46319）、5'-キサンチル酸生産

性変異株（特開昭50-156399）などを用いる方法が知られている。

#### 発明が解決しようとする問題点

従来法によるイノシン、イノシン酸、キサンチル酸などの核酸関連物質の生産は必ずしも満足すべきものではなく、調味料、医薬品原料として重要なこれら核酸関連物質をより高収率で安価に製造する方法の開発が望まれている。

#### 問題点を解決するための手段

本発明者は微生物を用いる核酸関連物質の生産において、従来の突然変異の付与による育種とは全く異なる、組換えDNA技法による核酸関連物質生産菌株の育種方法について研究を重ねた。その結果、核酸関連物質の生合成に係る酵素であるA P T a s e の遺伝子（以下p u r Fと略記することがある）を含むDNA断片とベクターDNAとの組換え体DNAを保有させた菌株が核酸関連物質の高い生産性を有することを見出し、本発明を完成するに至った。

以下に本発明を詳細に説明する。

本発明は、微生物のA P T a s e の合成に関与する遺伝情報を担うDNA断片とベクターDNAとの組換え体DNAを保有し、コリネバクテリウム属またはブレビバクテリウム属に属し、かつ核酸関連物質を生産する能力を有する微生物を培地に培養し、培養物中に核酸関連物質を生成蓄積させ、該培養物から該核酸関連物質を採取することの特徴とする核酸関連物質の製造法を提供する。

該核酸関連物質としては、イノシン、イノシン酸またはキサンチル酸などがあげられる。

本発明に用いるA P T a s e の遺伝子（p u r F）を含むDNA断片としては原核生物、バクテリオファージまたはプラスミドに由来するものが用いられるが、なかでも細菌特にエシェリヒア属、コリネバクテリウム属またはブレビバクテリウム属に属する細菌由来のp u r Fを含むDNA断片が好適に用いられる。具体的には大腸菌K12株の染色体DNA由来のp u r Fを含むDNA断片があげられる。

本発明に用いるベクターとしてはコリネバクテ

リウム属またはブレビバクテリウム属菌種内で自律増殖できるものであればいずれも用いることができる。具体的にはp C G 1、p C G 2、p C G 4 p C G 11、p C E 5 2、p C E 5 3、p C E 5 4などが好適に用いられる。これらベクターについては特開昭57-134500、特開昭57-183799、特開昭58-35197、特開昭58-105999、特開昭58-126789、特開昭59-156292にそれぞれ記載されている。

p u r Fを含む供与体DNAとベクターDNAとの組換え体DNAは、試験管内で両DNAを制限酵素で切断した後、DNAリガーゼで再連結反応した後、この結合反応混合物を用いて、p u r Fを欠失したコリネバクテリウム属またはブレビバクテリウム属菌種を形質転換し、欠損形質が相補された形質転換株を選択することによって得ることができる。コリネバクテリウム属またはブレビバクテリウム属菌種で直接組換え体DNAを選択するかわりに、たとえば大腸菌のような親に遺伝子組換え技法が確立している宿主-ベクター系

を用いてpurFを分離し、しかる後にコリネバクテリウム属またはブレビバクテリウム属菌種にてこの分離遺伝子を発現させることもできる。すなわち、purFの供与体DNAを、大腸菌とコリネバクテリウム属またはブレビバクテリウム属菌種とのシャトルベクターDNAと試験管内で結合反応させ、この反応混合物を用い、purFが欠損した大腸菌の変異株を形質転換する。ついで、欠損形質が相補された形質転換株を選択し、この形質転換株から組換え体プラスミドを単離する。この組換え体プラスミドを用いてコリネバクテリウム属またはブレビバクテリウム属菌種を形質転換し、形質転換株を選択分離することによっても目的とする組換え体DNAを取得できる。大腸菌とコリネバクテリウム属またはブレビバクテリウム属菌種とのシャトルベクターとしてはpCE52、pCE53、pCE54などが使用できる。

本発明の宿主微生物としては、コリネバクテリウム属またはブレビバクテリウム属に属しDNA取込み能を有する微生物であれば、野生株の他に

薬剤耐性、栄養要求性などの性質を有する変異株、核酸関連物質生産性を有するまたは失った変異株など、いかなる菌株を用いてもよい。好適にはブレビバクテリウム・アンモニアゲネスATCC 5872や、この菌株を親株として変異誘導された核酸関連物質生産菌株たとえば5'-イノシン酸生産菌ブレビバクテリウム・アンモニアゲネスKY13184(FERM P-3790)、5'-キサンチル酸生産菌ブレビバクテリウム・アンモニアゲネスATCC 21075、イノシン生産菌ブレビバクテリウム・アンモニアゲネスATCC 21477などがあげられる。

微生物の形質転換法として、特開昭57-185492にコリネバクテリウム属またはブレビバクテリウム属に属する微生物の形質転換法について報告がある。しかし、本発明で宿主微生物として好適に用いることができるブレビバクテリウム・アンモニアゲネスは、ブレビバクテリウム属に属してはいるものの、他のブレビバクテリウム属菌種、たとえばブレビバクテリウム・フラバムなどとは、

染色体DNAの相同性が明らかに異なる(インタナショナル・ジャーナル・オブ・システムティック・バクテリオロジー(Int. J. Sys. Bacteriol.) 31, 131, (1981))ため、従来の遺伝子組換え技法においては、宿主微生物としては利用されていない。本発明により、ブレビバクテリウム・アンモニアゲネスを宿主微生物として用いる遺伝子組換え技法が確立した点で、本発明はさらに有用である。

宿主微生物の組換え体DNAによる形質転換は(1)培養細胞からのプロトプラストの調製、(2)組換え体DNAによるプロトプラストの形質転換処理、(3)プロトプラストの正常細胞への復帰再生と形質転換株の選択からなる工程にて行われる。具体的方法をブレビバクテリウム・アンモニアゲネスを用いた例により以下に示す。

#### (1) 培養細胞からのプロトプラストの調製

プロトプラストの調製は微生物を細胞壁の合成が阻害される条件下で増殖させ、この培養細胞に高張液中でリゾチームあるいはアクロモベ

プチダーゼなどを作用させて、細胞壁を溶解除去することによって行われる。栄養細胞を得るために使用する培地は、ブレビバクテリウム・アンモニアゲネスが生育できるものであればいずれでも使用できる。たとえばNB培地(第1表)のような完全栄養培地や、GⅢ培地(第2表)のような半合成培地などが使用できる。

第 1 表

粉末ブイヨン	20 g/l
酵母エキス	5 g/l
pH	7.2

第 2 表

グルコース	15 g/l
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	8 g/l
尿 素	1.2 g/l
酵母エキ	1.2 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5 g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5 g/l
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.1 g/l

特開昭63-248394(4)

FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	2mg/l
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1mg/l
MnSO <sub>4</sub> · 4-6H <sub>2</sub> O	1mg/l
ビオチン	0.1mg/l
サイアミン塩酸塩	2mg/l
パントテン酸カルシウム	10mg/l
アデニン	100mg/l
グアニン	100mg/l
pH	7.2

この培地にブレバクテリウム・アンモニアゲネスを接種し、20-40℃にて通気攪拌条件下で培養する。培地の吸光度(OD)を比色計にて経時的に測定し、菌の対数増殖期の初期(ODが0.1-0.15に達したとき)に細胞壁合成阻害剤を添加する。細胞壁合成を阻害する薬剤としては、ペニシリン、グリシンなどを使用することができる。これら薬剤の使用量は、微生物の生育を半ば抑制する濃度もしくはそれ以下が望ましく、ペニシリンの場合には培養液

中に0.1-2.0g/ml程度、またグリシンの場合には10-40mg/ml程度の濃度になるように添加する。薬剤添加後さらに培養を続け、数世代増殖させて栄養細胞を得る。

培養液から栄養細胞を集菌し、培地および高張液にて洗浄したのち、それぞれの高張培地に懸濁し、溶菌酵素処理を行う。洗浄に用いる培地としては前記のNB培地、GⅢ培地などが使用でき、高張液としてはP3高張液(第3表)が使用できる。

第 3 表

NaCl	7.0mM
MgCl <sub>2</sub>	5mM
CaCl <sub>2</sub>	5mM
N-トリス(ヒドロキシメチル)-メチル-2-アミノエタンスルホン酸	25mM
ソルビトール	1.6M
pH	7.6

また高張培地としては栄養培地、半合成培地、最少培地などに高張化薬剤として0.25-0.6Mシュクロース、0.3-0.7Mコハク酸2ナトリウム、0.4-2.0Mソルビトールのいずれかを添加したもの、あるいはP3高張液などを用いることができる。溶菌酵素処理は、卵白リゾチームあるいはアクロモベプテグゼなどを用いずとも0.1-5.0mg/ml程度の濃度となるように添加し、20-40℃にて5-20時間保持する。プロトプラストの生成は光学顕微鏡で観察することにより、球型の細胞として確認することができる。

このようにして調製したプロトプラストは、高張寒天培地において生育してコロニーを形成し、栄養細胞に再生する。再生を行わせるためには、通常3日から20日間、20-40℃に保つ。高張寒天培地としては、栄養培地、半合成培地、最少培地などに0.25-0.6Mのシュクロースまたは0.3-0.7Mのコハク酸2ナトリウムおよび寒天(ディフコ社製)14g/l

を添加したものなどが用いられる。

(2) 組換え体DNAによるプロトプラストの形質転換処理

プロトプラストの組換え体DNAによる形質転換は、細胞がプロトプラスト状態を保持できる高張液中でプロトプラストと組換え体DNAとを混合し、これにDNA取込み媒介作用のあるポリエチレングリコール(PEG、平均分子量1540-6030)と2価金属陽イオンを加えて処理することによって行われる。高張条件を与える安定化剤としては、微生物のプロトプラストの保持に一般に使われるものでよく、たとえばシュクロース、コハク酸2ナトリウム、ソルビトールなどを用いることができる。PEGの使用可能な濃度範囲は最終濃度で5-60%である。2価金属陽イオンとしては、たとえばCa<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Ba<sup>2+</sup>、Sr<sup>2+</sup>などが最終濃度1-100mMの範囲において効果的で、単独使用あるいは併用することができる。処理の温度は0-25℃が好適である。

### (3) プロトプラストの正常細胞への復帰再生と形質転換株の選択

プロトプラストの正常細胞への復帰再生と形質転換株の選択は次のように行う。組換え体DNAを用いて形質転換処理したプロトプラストの再生は、前記のプロトプラストの再生と同様に高張寒天培地上において行う。形質転換株は組換え体DNAに由来する遺伝子が菌に付与する形質について選択することによって取得できる。この特徴的形質獲得に基づく選択は、高張寒天培地上で再生と同時に進めてもよい。また、一旦非選択的に再生させてから再生正常細胞を集め通常の低張寒天培地上で選択を行ってもよい。

形質転換株は通常の栄養培地に培養することにより、導入した組換え体DNAの形質を発現させることができる。組換え体DNAの導入により形質転換株に薬剤耐性などの性質が付与されている場合は、その性質にあわせて培地に薬剤を添加することもある。

尿素、ペプトン、N<sub>2</sub>-アミン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチープリカー、カゼイン加水分解物、フィッシュミールあるいはその消化物などの窒素含有有機物、グリシン、グルタミン酸などの各種アミノ酸など種々のものが使用できる。無機物としてはリン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、硫酸マグネシウム、リン酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸亜鉛、炭酸カルシウムなどを用いることができる。さらに、用いる菌がアミノ酸、核酸、ビタミンなど特定の栄養素を生育に要求する場合には、培地にこれらの物質を適量添加するが、前記したような他の培地成分に伴って培地に供給されれば特に加えなくてもよい。

培養は接種培養あるいは通気攪拌培養などの好気的条件下で行う。培養温度は一般に20-40℃が好適である。培養期間は通常2-7日である。培地のpHはアンモニア水、尿溶液、水酸化ナトリウム溶液などで中性付近に保つこ

このようにして得られた形質転換株を、発酵法による核酸関連物質製造の際に用いられている培養方法により培養することによって核酸関連物質を製造することができる。すなわち該形質転換株を炭素源、窒素源、無機物、アミノ酸、ビタミンなどを含有する通常の培地中、好気的条件下において温度、pHなどを調整しつつ培養を行えば、培養物中に核酸関連物質が生成蓄積するのでこれを採取する。炭素源としては、グルコース、フラクトース、シュクロース、グリセロール、澱粉、澱粉加水分解液、糖蜜、糖蜜加水分解物などの炭水化物、グルコン酸、ビルビン酸、乳酸、酢酸などの各種有機酸、グリシン、グルタミン酸、アラニン、アスパラギン酸などのアミノ酸など、該生産菌が酸化可能なものであればいずれも使用可能である。窒素源としてはアンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、酢酸アンモニウムなどの各種無機および有機アンモニウム塩、

とが望ましい。このようにして培養物中に蓄積した核酸関連物質が蓄積する。培養終了後、イオン交換樹脂法、吸着法、沈殿法、抽出法などの単独または組合せにより、培養物から核酸関連物質を回収することができる。

次に実施例を示す。

#### 実施例1

##### (1) p u r F の p C E 5 3 へのクローニング

大腸菌の染色体DNAは、大腸菌K12株(エシェリヒア・コリATCC33525)

をバクトトリプトン(ディフコ社製) 10 g/ℓ、

酵母エキス(ディフコ社製) 5 g/ℓ、

NaCl 5 g/ℓを含み、pHを7.2に調整したL培地に接種し、30℃で18時間培養後、得られた培養菌体からスミスのフェノール抽出法[Smith, H. G.; メソッズ・イン・

エンチモロジイ(Methods in Enzymology), 12, Part A, 545(1967)]に従い単離した。

p C E 5 3 はこのプラスミドを保有する大腸菌12株亜株MM294(特開昭60-216994

号公報参照) から、該公報記載の方法により分離精製した。

上記で調製した大腸菌K12株の染色体DNA10μgを10mMトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(以下トリスと略す)・塩酸(pH7.5)、100mM NaCl、7mM MgCl<sub>2</sub>および6mM 2-メルカプトエタノールを含む緩衝液(以下Y-100緩衝液と称する)40μlに溶かし、24単位の制限酵素Pst I(宝酒造社製、以下特記しない限り制限酵素はすべて宝酒造社製)と20単位の制限酵素BamHIを加え、37℃で1時間消化反応を行った。その後、65℃で、10分間の熱処理により反応を停止させた。一方pCE53プラスミドDNA3μgをY-100緩衝液20μl中に溶かし、12単位のPst Iと10単位のBamHIを加え、37℃で1時間消化反応を行い、65℃で、10分間の熱処理により反応を停止させた。両消化物を混合した後、20mMトリス

塩酸(pH7.6)、10mM MgCl<sub>2</sub>、10mMジチオスレイトールおよび0.5mM ATPを含む緩衝液(以下T4DNAリガーゼ緩衝液と称する)120μlおよび3単位のT4DNAリガーゼ(宝酒造社製)を加えて、18時間処理した。このようにして得られたT4DNAリガーゼ反応混合物を用い、purF欠損によるヒポキサンチン要求性の<sup>+</sup>大腸菌FL-46株をコーエン(Cohen)らの方法(Cohen et al., :プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci.) U. S. A., 69, 2110(1972))により形質転換し、選択培地(グルコース2g、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3g、NaCl 0.5g、NH<sub>4</sub>Cl 1g、MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 0.5g、CaCl<sub>2</sub>・2H<sub>2</sub>O 15mg、ナイアミン塩酸塩4mg、カザミノ酸2g、レートリプトファン50mg、カナマイシン50mgおよび寒天16gを水1ℓに含みpH7.2に調

整した培地)に塗布後、37℃で3日間培養することによりカナマイシン(50μg/ml)に耐性で、かつ宿主が示すヒポキサンチン要求性が相補された形質転換株を得た。

この形質転換株からプラスミドをアンの方法(An G. et al., ジャーナル・オブ・バクテリオロジー(J. Bacteriol.), 140, 400(1979))により分離精製しPst Iなどの制限酵素で消化することによりプラスミドの構造解析を行った。その結果、pCE53のPst I-BamHI断片に大腸菌K12株の染色体DNA由来の約9kbのPst I-BamHI DNA断片が挿入された組換え体プラスミドであることを確認し、このプラスミドをpEF12と名付けた。pEF12を用い、大腸菌FL-46株をコーエンらの方法により再形質転換したところ、カナマイシン耐性株として選択される形質転換株のすべてがヒポキサンチン非要求性となっていた。これら

により、pEF12にpurFがクロ

ン化されていることが確認された。  
(2) プラスミドpEF12のプレバクテリウム・アンモニアゲネスへの導入

(1)にて分離精製したプラスミドpEF12をプレバクテリウム・アンモニアゲネスATCC5872の形質転換に供した。

形質転換は下記のようにして調製したATCC5872株のプロトプラストを用いて行った。ATCC5872株をNB培地で30℃で、16時間振盪培養し、その種培養液0.8mlをGⅢ培地8mlの入ったL字型試験管に接種し、モノー型振盪培養液を用いて30℃で振盪培養した。培地の吸光度を東京光電比色計にて経時的に測定し、対数増殖期の初期(培養時間約3時間、菌体濃度約10<sup>8</sup>個/ml)に0.3U/mlになるようにペニシリンGを添加し、さらに3時間培養を続けた。培養液から菌体を集菌しGⅢ培地で洗浄後、2.0mg/ml卵白リゾチーム、0.6mg/mlアクトモベプチダーゼ含有P3高張液1mlに再懸濁し、30

で16時間静置してプロトプラスト化した。

このプロトプラスト懸濁液0.5mlを小試験管にとり、 $2,500 \times g$ 、10分間遠心分離し、TSMC緩衝液(10mM  $MgCl_2$ 、30mM  $CaCl_2$ 、50mM トリス-塩酸、0.4M シュクロース、pH7.5) 1mlに再懸濁して遠心洗浄後、TSMC緩衝液0.1mlに再懸濁した。この懸濁液にpEF12プラスミドDNA 10 $\mu g$ を含むTSMC緩衝液0.1mlを加えて混和し、次いでTSMC緩衝液中に20%ポリエチレングリコール(PEG) 5,000(半井化学薬品社製)を含む液0.8mlを添加して混合した。10分後、GⅢ培地2mlを添加し、 $2,500 \times g$ 、10分間遠心分離し上澄液を除去した。沈降したプロトプラストを1mlのGⅢ培地に懸濁してから、該懸濁液の0.2mlをカナマイシン200 $\mu g/ml$ を含む高張寒天培地(GⅢ培地に0.5Mコハク酸2ナトリウム、1.4%寒天を含む)に塗布し、30℃で14日間培養し、培地上に生育して

リゾチーム-アクロモベプチダーゼ液(12.5%シュクロース、0.1M  $NaCl$ 、0.05M トリス-塩酸、3mg/mlリゾチーム、1mg/mlアクロモベプチダーゼ、pH8.0)で10mlに懸濁し、37℃で4時間反応させた。反応液に5M  $NaCl$  2.4ml、0.5M EDTA (pH8.0) 0.6ml、4%ラウリル硫酸ナトリウムと0.7M  $NaCl$ からなる溶液4.4mlを順次添加し、緩やかに混和してから氷水中に16時間置いた。溶菌物全体を遠心分離管に移し、4℃で60分間 $69,000 \times g$ の遠心分離を行い上清液を回収した。これに重量百分率10%相当のPEG 5,000を加え、静かに混和して溶解後、氷水中に置いた。10時間後、 $1,500 \times g$ で10分間遠心分離してペレットを回収した。TES緩衝液5mlを加えてペレットを静かに再溶解してから、1.5mg/mlエチジウムブロマイド2.0mlを添加し、これに塩化セシウムを加えて静かに溶解し密度を1.380に合わせた。

くるカナマイシン耐性の形質転換株T-51を得た。得られた形質転換株は、ブレバクテリウム・アンモニアゲネスT-51 (FERM BP-1332)として、昭和62年4月3日付で工業技術院微生物工業技術研究所(微工研)に寄託されている。

### (3) ブレバクテリウム・アンモニアゲネスからのプラスミドの調製

②で得られた形質転換株T-51 (FERM BP-1332)からpEF12プラスミドを次のようにして単離、精製した。NB培地で30℃、16時間振盪培養し、その培養液4mlをGⅢ培地400mlに接種し、30℃で振盪培養した。対数増殖期の初期(菌体濃度 $10^8$ 個/ml)に0.3U/mlになるようにペニシリンGを添加し、さらに5時間培養を続けた。培養液から菌体を集菌しTES緩衝液(30mM トリス-塩酸、5mM エチレンジアミン4酢酸2ナトリウム(EDTA)、50mM  $NaCl$ 、pH8.0)で洗浄後、

この溶液を20℃、 $105,000 \times g$ で40時間超遠心分離にかけた。この密度勾配遠心により共有結合で閉じられた環状のDNAは紫外線照射下に遠心チューブ中下方の密度の高いバンドとして見出された。このバンド部分を注射器で遠心チューブの側面から抜き取ることによってpEF12プラスミドDNAを含む液を分離した。次いで分離液を等容量のイソプロパノール(容量百分率、イソプロパノール:TES緩衝液=9:1(なおこのTES緩衝液は飽和溶解量の塩化セシウムを含む))で5回処理してエチジウムブロマイドを抽出除去し、しかる後にTES緩衝液に対して透析した。

こうして単離、精製したプラスミドDNAをPst Iなどの制限酵素で消化することによって構造解析を行った。その結果、①で確認したpEF12と同じ構造を有していることが確認された。

### (4) プラスミドのイノシン生産性菌株への導入



と、該形質転換体のAPTase活性の測定  
イノシン生産能を有するブレバクテリウ  
ム・アンモニアゲネスATCC21477を  
(2)と同様の方法でプロトプラスチ化したのち  
(3)にて単離、精製した組換え体プラスミド  
pEF12を用いて形質転換し、カナマイシ  
ン耐性の形質を有する形質転換株を取得した。

ATCC21477および形質転換株  
ATCC21477/pEF12のAPTaseの  
活性の測定は公知の方法(J. M. Lewis and  
S. C. Hartman, メソッズ・イン・エンチモロジ  
イ(Methods in Enzymology), 51, 171-178  
(1978))を若干改変して下記のように実施し  
た。

活性測定に供する菌体を、100mlのGⅢ  
培地を含む500mlの三角フラスコを用いて  
30℃で、16時間妥速培養し、得られた菌体  
を超音波で破砕して菌液を調製した。これ  
を6,000×g、30分間遠心分離して得た上  
清を粗酵素液として用い、30mMトリス-

塩酸(pH8.0)、9mM MgCl<sub>2</sub>、16  
mMフッ化カリウム(KF)、3mMホスホ  
リボシルピロリン酸、12mMグルタミンか  
らなる溶液0.3ml中で25℃で、5分間反応さ  
せた。なおグルタミンを含まないものを対照  
実験とした。反応終了後、0.1mlの1.0M酢  
酸ナトリウム溶液(pH5.0)、0.05mlの  
3mMピロリン酸ナトリウム溶液、0.1mlの  
0.1M塩化マンガン溶液を順次加えた後、

1,500×g、5分間遠心分離してペレットを  
回収した。これに0.5mlの0.01M塩化マン  
ガン溶液、0.1mlの10%アセトン溶液を順  
次加えて洗浄後、遠心分離してペレットを回  
収した。このペレットに1.0N硫酸1.0mlを  
加え、100℃で、15分間加熱した。冷却後、  
無機リン測定用アッセイキット(和光純薬社  
製)を用いてリンの定量を行い、グルタミン  
依存性の活性を測定することによりAPTase  
活性を求めた。第4表に活性測定結果を示す。

第 4 表

菌 株	APTase 活性 ( $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ タンパク)
ATCC 21477	8.2
ATCC 21477/pEF12	12.7

pucFを含む組換え体プラスミドpEF  
12が導入されたことにより、APTase  
活性が1.5倍に増大しており、明らかに活性  
上昇効果が認められた。

## (5) 形質転換株によるイノシンの生産

ブレバクテリウム・アンモニアゲネス  
ATCC21477およびその形質転換株  
ATCC21477/pEF12のイノシン  
生産性を調べた。

両菌株を各々NB培地20mlを含む250  
ml容三角フラスコに一白金耳ずつ接種し、  
30℃で、24時間培養して得た培養液を、  
生産培地(グルコース130g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
10g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10g、MgSO<sub>4</sub>・  
7H<sub>2</sub>O 10g、コーンステープリカー

20g、CaCl<sub>2</sub>・2H<sub>2</sub>O 0.1g、  
FeSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 10mg、ZnSO<sub>4</sub>・  
7H<sub>2</sub>O 2mg、MnCl<sub>2</sub>・4-6H<sub>2</sub>O  
2mg、ビオチン30μg、ビタミンB<sub>12</sub> 5mg、  
パントテン酸カルシウム10mg、ニコチン酸  
5mg、アデニン100mg、グアニン100mg、  
尿素4gを純水1ℓに含みpH7.5に調整し  
た培地)20mlを含むバッフルプレート付  
250ml容三角フラスコに10%(容積比)  
の割合で接種し、30℃で4日間、220  
rpmにて振盪培養した。培養中48および  
72時間目に別殺菌した尿素を2g/ℓの割  
合で添加しpHを調整した。培養終了後、培  
養物中のイノシン蓄積量をペーパークロマト  
グラフィーにより定量した。その結果を第5  
表に示す。

第 5 表

菌 株	イノシン (g/ℓ)
ATCC 21477	5.2
ATCC 21477/pEF12	9.4

第 6 表

菌 株	A P T a s e 活性 ( $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ 乾重)
KY13184	7.1
KY13184/pEF12	10.4

第 7 表

菌 株	5'-イノシン酸 (g/l)
KY13184	20.1
KY13184/pEF12	24.9

pEF12が導入されたことにより、APTase活性の上昇、5'-イノシン酸生産性の改善が認められた。

## 実施例3

実施例1の(3)で単離、精製した組換え体プラスミドpEF12を用い、5'-キサンチル酸生産能を有するプレバクテリウム・アンモニアゲネスATCC21075を形質転換した。形質転換は、ペニシリン濃度を0.5 U/mlとしてプロトプラストを調製する以外に実施例1の(2)と同様にして行い、カナマイシン耐性形質を獲得した形質転換株

purfを含む組換え体プラスミドpEF12を導入したことにより、顕著なイノシン生産性の改善が認められた。

## 実施例2

実施例1の(3)で単離、精製した組換え体プラスミドpEF12を用い、5'-イノシン酸生産能を有するプレバクテリウム・アンモニアゲネスKY13184 (FERM P-3790)を、実施例1の(2)と同様の方法でプロトプラスト化したのち形質転換し、カナマイシン耐性の形質を有する形質転換株を取得した。該形質転換株KY13184/pEF12のAPTase活性の測定を実施例1の(4)と同様の方法で実施した。その結果を第6表に示す。また該形質転換株KY13184/pEF12を実施例1の(5)と同様にしてペーパークロマトグラフィーにより5'-イノシン酸を定量した。蓄積した5'-イノシン酸の量を第7表に示す。対照菌株として菌株KY13184を用い同様に実施した。

を取得した。該形質転換株ATCC21075/pEF12のAPTase活性の測定を実施例1の(4)と同様の方法で実施した。対照としてATCC 21075株を用い同様に処理した。結果を第8表に示す。

第 8 表

菌 株	A P T a s e 活性 ( $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ 乾重)
ATCC21075	8.9
ATCC21075/pEF12	14.7

purfを含む組換え体プラスミドpEF12が導入されたことにより、APTase活性の上昇が認められた。

次に該形質転換株ATCC21075/pEF12の5'-キサンチル酸生産能を調べた。プレバクテリウム・アンモニアゲネスATCC21075およびATCC21075/pEF12をNB培地20 mlを含む250 ml容三角フラスコに各々白金耳ずつ接種し、30℃で、24時間培養して得た培養液を実施例1の(5)と同じ組成の生産培地20 mlを含む250 ml容三角フラスコに10% (容量比)

の割合で植菌し、30℃で4日間、220 rpmにて振盪培養した。培養中48および72時間目に別殺菌した尿素を2 g/lの割合で添加しpHを調整した。蓄積した5'-キサンチル酸をペーパークロマトグラフィーにより定量した。結果を第9表に示す。

第 9 表

菌 株	5'-キサンチル酸 (g/l)
ATCC21075	14.8
ATCC21075/pEF12	19.5

purfを含む組換え体プラスミドpEF12が導入されたことにより、5'-キサンチル酸の生産性改善が認められた。

## 発 明 の 効 果

本発明方法により、プリンスクレオチド生合成に関与する酵素であるAPTaseの遺伝子を含む組換え体DNA、該組換え体DNAを保有させたコリネバクテリウム属またはプレバクテリウム属に属する微生物および該微生物を用いた核酸関連物質の製造法を提供することができる。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**